

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE & DE PHARMACIE
DE LYON

ANNÉE 1965 - N° 1 3 1

**ETUDE COMPARATIVE DE LA COMPOSITION
PROTEIQUE (SIDEROPHILINE EN PARTICULIER)
DU LIQUIDE CEPHALORACHIDIEN ET DU
SERUM SANGUIN DE CERTAINS
MAMMIFERES ET DE L'HOMME**

THÈSE

PRÉSENTÉ

A LA FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

DE LYON

ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 1 JUILLET 1965

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

par

Jean-Louis BOURLIER

Ancien Elève de l'Ecole du
Service de Santé Militaire

Né le 30 Janvier 1938 à VITRY-LE-FRANÇOIS (Marne)

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE & DE PHARMACIE
DE LYON

ANNÉE 1965 - N° 1 3 1

**ETUDE COMPARATIVE DE LA COMPOSITION
PROTEIQUE (SIDEROPHILINE EN PARTICULIER)
DU LIQUIDE CEPHALORACHIDIEN ET DU
SERUM SANGUIN DE CERTAINS
MAMMIFERES ET DE L'HOMME**

THÈSE

PRÉSENTÉ

A LA FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE
DE LYON

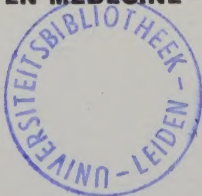
ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 1 JUILLET 1965

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

par

Jean-Louis BOURLIER

Ancien Elève de l'Ecole du
Service de Santé Militaire



Né le 30 Janvier 1938 à VITRY-LE-FRANÇOIS (Marne)

FACULTE MIXTE DE MEDECINE
ET DE PHARMACIE DE LYON

PERSONNEL DE LA FACULTE

Doyens Honoraires : M. J. LEPINE - Membre de l'Institut
M. H. HERMANN - Correspondant de l'Institut

Doyen : M. J. F. CIER

Assesseurs : MM. M. LEVRAT
L. REVOL

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. PATEL, LEPINE, TRILLAT, MOURIQUAND, MAZEL, GARIN, GATE, MARTIN, GABRIELLE, SANTY, DUCLOS, GUILLEMINET, HERMANN, ROCHET, POLLOSSON.

PROFESSEURS

MM. CIBERT	Clinique urologique
PONTHUS (Détaché à Beyrouth)	Physique biologique
DECHAUME	Clinique neuro-psychiatrique et d'hygiène mentale
CHAMBON	Chimie organique et toxicologie
WERTHEIMER	Clinique chirurgicale B
PAUPERT-RAVAULT	Clinique médicale B
FROMENT	Clinique et prophylaxie cardio-vasculaires
CROIZAT	Clinique médicale C
ENSELME	Chimie biologique et médicale
MALLET-GUY	Clinique chirurgicale A
REVOL	Pharmacie galénique
PIGEAUD	Clinique obstétricale
BOURRET	Médecine du travail
LEVRAT	Clinique médicale A
SOHIER	Hygiène et action sanitaire et sociale
NETIEN	Botanique et cryptogamie
BERTRAND	Clinique chirurgicale C
BADINAND	Chimie analytique pharmaceutique
DREVEN	Pharmacie chimique et pharmacologie
ROCHE	Médecine légale et déontologie
COUDERT	Parasitologie et pathologie exotique
MOUNIER-KUHN	Clinique d'oto-rhino-laryngologie et d'audio-phonologie
PAUFIQUE	Clinique ophtalmologique
THIERS	Clinique de dermatologie, syphiligraphie et allergologie
BRUN	Clinique de pneumo-phthisiologie
CREYSSEL	Clinique chirurgicale orthopédique et traumatologique
DARGENT	Clinique carcinologique
GUICHARD	Anatomie pathologique
GIRARD Paul	Pathologie générale et expérimentale
LATARJET	Anatomie
PEYCELON	Pathologie chirurgicale
GIRARD Marcel	Clinique médicale D
VACHON	Pathologie médicale
GALY	Physio-pathologie des voies respiratoires
PAPILLON	Radiologie
JEUNE	Clinique médicale infantile et hygiène du 1er âge
GONIN	Thérapeutique
MONNET	Bactériologie
BANSSILLON	Physiologie et pathologie obstétricales
CHATONNET	Physiologie B
GUINET	Clinique endocrinologique
TRILLAT	Clinique de chirurgie orthopédique
FREIDEL	Clinique stomatologique
MARION Joseph	Clinique de chirurgie et d'orthopédie infantiles
DORCHE	Matière médicale et législation pharmaceutique
DUMONT Louis	Histologie et embryologie
PERROT	Chimie

MM. CIER J.F.
 PERRIN J.
 MICHARD Pierre
 SARROUY Charles
 MATHEU
 FAUCON
 X.....
 X.....

Physiologie A
 Thérapeutique chirurgicale et chirurgie opératoire
 Clinique de chirurgie cardiaque
 Clinique médicale infantile
 Clinique gynécologique
 Biologie médicale et pharmacodynamie
 Clinique des maladies infectieuses
 Hydrologie thérapeutique, climatologie et écologie sociale

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

MM. BERGER
 BERTOYE
 MANSUY
 COLLET
 LACROIX
 LIARAS
 LECUIRE
 REVOL
 GOINARD
 CIER André
 PONT Maurice
 TRAEGER

Physique nucléaire appliquée à la médecine
 Bactériologie
 Neuro-chirurgie
 Chimie générale et pharmaceutique
 Hygiène et climatologie
 Clinique chirurgicale propédeutique
 Neuro-chirurgie
 Médecine générale
 Thérapeutique chirurgicale
 Pharmacie chimique et pharmacologie
 Médecine générale
 Médecine générale

PROFESSEURS SANS CHAIRE

MM. ROMAN
 FEROLDI
 MORET
 ODDOUX
 de SOLLIERS
 DESPIERRES
 GARIN
 TOLOT

Parasitologie
 Anatomie pathologique
 Physique biologique
 Botanique et cryptogamie
 Chimie analytique
 Médecine générale
 Parasitologie
 Médecine du travail

MAITRES DE CONFERENCES-AGREGES TITULAIRES

MM. CREYSSEL Roger
 THIVOLET
 PINET
 GUYOTAT
 DESCOTES
 JOUVET
 PEYRIN
 TOMMASI
 BUFFARD
 LEJEUNE
 de MOURGUES F.
 NAUSSAC
 REBOUILLAT
 ROMAGNY
 DELAHAYE
 DELEUZE
 GIRAUD
 MICHEL
 FRANCOIS
 MICHOUlier
 COLOMB
 LAMBERT
 FRIES
 GILLY
 ROBERT
 BOUCHET
 BETHENOD
 GERMAIN
 KALB
 LARBRE
 SOUSTELLE
 VIALA
 VINCENT
 COLIN

Chimie biologique
 Hygiène
 Electro-radiologie
 Neuro-psychiatrie
 Chirurgie générale
 Pathologie expérimentale
 Physique biologique
 Anatomie pathologique
 Electro-radiologie
 Médecine générale et thérapeutique
 Stomatologie
 Maladies infectieuses
 Chirurgie générale
 Pédiatrie
 Médecine générale
 Anesthésiologie
 Electro-radiologie diagnostique et thérapeutique
 Anesthésiologie
 Pédiatrie et puériculture
 Chirurgie générale
 Dermatologie
 Médecine générale
 Médecine générale
 Pédiatrie
 Médecine générale
 Anatomie
 Pédiatrie
 Immunologie, sérologie, hématologie
 Pneumo-phthisiologie
 Pédiatrie
 Chirurgie générale
 Médecine générale
 Bactériologie, parasitologie, virologie
 Médecine légale

MAITRES DE CONFERENCES-AGREGES STAGIAIRES

MM. FAVRE-GILLY
GIROD
GRAS
MALLEIN
RIFFAT
FLANDROIS
VIALIER-RAYNARD
ROLLET

Hématologie
Histologie et embryologie
Chimie biologique
Chimie analytique
Hygiène
Physiologie
Bactériologie
Pharmacie galénique

AGREGES EN EXERCICE

MM. BONAMOUR
de MOURGUES Georges
DEVIC
DUMONT Martial
DURAND
FRANCILLON
SAUBIER
SCHOTT
ALLEGRE
CHASSARD
FAYSSE
GAILLARD
GARDE
HUGONNIER
MARET
MORNEX
MOUNIER-KUHN Alain
NORMAND
PERRIN André
DUMAS
GARMIER
NOEL
SCHNEPP

Ophtalmologie
Chirurgie générale
Médecine générale
Obstétrique
Urologie
Chirurgie générale
Chirurgie générale
Neuro-psychiatrie
Neuro-chirurgie
Electro-radiologie
Orthopédie
Oto-rhino-laryngologie
Médecine générale
Ophtalmologie
Chirurgie générale
Médecine générale
Chirurgie générale
Médecine générale
Médecine générale
Stomatologie
Obstétrique
Médecine générale
Orthopédie

EXAMINATEURS DE LA THESE

Président : M. le Professeur J-F. CIER

Assesseurs : MM. CREYSSEL
ROBERT
FLANDROIS

A MES PARENTS :

Par leur présence de tous les instants ils ont aidé à la réalisation de ma vocation.

Ce travail leur est dédié, en témoignage de ma grande affection.

A MA FEMME :

Son dévouement et sa collaboration nous donnent une nouvelle preuve de l'Amour qu'elle nous porte et que nous partageons pour notre fils Laurent.

A MA SOEUR :

Toute mon admiration

A MA BELLE MERE :

qui m'a témoigné une affection sincère

A TOUS LES MIENS :

A TOUS MES CAMARADES D'ETUDES, A TOUS MES AMIS.

A NOTRE MAITRE et PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur J-F. CIER
Doyen de la Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie de Lyon

Il nous a fait l'honneur d'accepter la présidence
de notre jury de thèse.

Qu'il nous permette de lui témoigner toute notre
reconnaissance et de lui exprimer notre plus profond
respect.

A NOS MAITRES et Juges

Monsieur le Professeur Agrégé R. CREYSSEL

Qu'il soit assuré de notre vive gratitude pour l'honneur qu'il nous a fait d'apporter à notre travail la caution de son autorité scientifique dans le domaine des protéines.

Monsieur le Professeur Agrégé J-M. ROBERT

Nous le remercions d'avoir accepté de juger notre travail.

Qu'il trouve ici l'expression de notre profonde gratitude.

Monsieur le Professeur Agrégé FLANDROIS

Qu'il nous permette d'exprimer notre profond respect pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de siéger à notre jury.

A Monsieur le Professeur Agrégé CHATONNET

Il a mis à notre disposition son Laboratoire pour le recueil des liquides céphalorachidiens de Chiens. Avec nos remerciements et notre plus profond respect.

A Monsieur le Docteur Y. MANUEL
Chargé de recherches au C.N.R.S.

Il nous a confié ce travail qu'il a inspiré. Il nous a fait bénéficier de ses connaissances et nous a fait partager son enthousiasme pour l'élaboration de celui-ci. Nous le remercions respectueusement pour l'accueil bienveillant qu'il nous a toujours réservé dans son laboratoire et pour l'aide précieuse qu'il nous a apportée.

A Monsieur le Médecin-Général Inspecteur BORON

Professeur Agrégé du Val-de-Grace
Directeur de l'Ecole du Service de Santé Militaire
et de l'Hôpital Militaire d'Instruction Desgenettes.

A Monsieur le Médecin-Colonel GROSSETETE

Bactériologiste des Hôpitaux de l'Armée
Médecin-chef de l'Hôpital Militaire d'Instruction Des-
genettes.
Sous-Directeur de l'Ecole du Service de Santé Militaire.

Nous remercions particulièrement Monsieur le Docteur NICOLAS de l'Institut Mérieux qui nous a donné la possibilité de recueillir les liquides céphalorachidiens de Singes.

Nous remercions aussi tout particulièrement le personnel du Laboratoire de Biochimie oculaire (Clinique Ophtalmologique, Hôpital E. HERRIOT) pour leur sympathique collaboration.

INTRODUCTION

Les différences dans la composition protéique qui existent entre le liquide céphalorachidien et le sérum sanguin correspondant chez l'Homme, nous ont amené à essayer de trouver chez l'animal des différences comparables qui puissent permettre une expérimentation chez ce dernier en vue de déterminer l'origine de ces modifications.

En effet, dans le liquide céphalorachidien humain on note la présence de fractions protéiques qui sont, soit absentes du sérum sanguin, soit très modifiées dans leurs rapports avec les autres protéines. De plus une protéine particulière, la sidérophiline, présente des anomalies importantes dans le liquide céphalorachidien humain. Il existe dans ce dernier liquide une deuxième sidérophiline, tout à fait caractéristique. Il était intéressant de voir si dans le règne animal on retrouvait les mêmes modifications toujours en vue d'amorcer une étude expérimentale sur ce sujet.

METHODES ET MATERIEL

Dans ce chapitre, nous envisagerons successivement :

I Le recueil du liquide céphalorachidien (L.C.R.)

II Le dosage des protéines totales et la concentration du L.C.R.

III Les méthodes :

- électrophorétiques et immunoélectrophorétiques.
- l'autoradiographie
- Méthodes enzymatiques

I/ RECUEIL DES LIQUIDES CEPHALORACHIDIENS ET DES SERUMS

1°) Le Chien :

Nous avons utilisé pour cette étude, 10 Chiens du Laboratoire de Physiologie B de la Faculté de Médecine. Leur poids était de 10 à 16 kg en moyenne.

La technique employée était celle de la ponction sous-occipitale. L'animal à jeun depuis la veille, nous avons opéré sous anesthésie générale (Nesdonal intra-veineux). Le Chien était placé en décubitus latéral, tête hyperfléchie, la nuque rasée, nous introduisons au niveau de IV ventricule un trocart 8/10, le repère osseux étant fourni par le bord supérieur de la première vertèbre cervicale, nous faisons pénétrer le trocart de 2,5 à 3 cm sur la ligne médiane, jusqu'à perforation de la membrane atloïdienne.

Le liquide céphalorachidien s'écoule alors spontanément, goutte à goutte ; il est recueilli par aspiration lente sur seringue sèche jusqu'à concurrence de 8 à 10 ml. Avant de retirer le trocart, nous injectons 5 ml de sérum physiologique pour compenser le déficit liquidien.

Ces liquides obtenus subissaient alors :

- une centrifugation de 10 000 tours/minute pendant 10 minutes ;
- un dosage du taux protéique, qui était de l'ordre de 0,30 à 0,50 g °/°.
- un test à la benzidine pour vérifier que le liquide

céphalorachidien n'était pas contaminé par le sérum.

Enfin, après avoir ajouté quelques cristaux d'azothydrate de Sodium, nous les avons rassemblés en un pool unique.

Par cette technique, certains animaux ayant été ponctionnés à 5 reprises à intervalle de 6 à 10 jours, nous avons recueilli 125 ml de L.C.R. de Chien, compte tenu des pertes (élimination des liquides hémorragiques).

Sur les mêmes animaux ; nous avons prélevé, en même temps, par ponction veineuse, 10 à 15 ml de sang ce qui nous permettait d'obtenir après centrifugation, les sérums correspondants aux liquides céphalorachidiens à obtenir.

2° Le Singe

Nous avons eu à notre disposition 3 espèces différentes :

Babouins

Patas

Cinocéphales.

Notre étude se limitera aux liquides céphalorachidiens et sérums de Babouins, la quantité obtenue dans les 2 autres espèces étant trop faible.

La technique de ponction était semblable à celle employée chez le Chien, aux différences près que le recueil des liquides céphalorachidiens s'effectuait 10 à 15 minutes après la mort de l'animal, celui-ci étant sacrifié par section des vaisseaux du cou.

La quantité de liquide céphalorachidien prélevé sur chaque animal était de 4 à 6 ml maximum ; nous avons pu ainsi collecter sur une quarantaine de Singes Babouins, 140 ml de liquide céphalorachidien. Ces liquides ont subi les mêmes vérifications que celles subies par les liquides céphalorachidiens de Chien.

Les taux protéiques étaient toujours assez élevés : de l'ordre de 0,50 à 0,80 g °/°.

Les sérums obtenus à partir de ces animaux nous ont permis

de purifier en partie de la sidérophiline et aussi, par étude comparative, d'éliminer les variations génétiques des transferrines.

II/ LE DOSAGE

Nous utilisons 2 techniques couplées :

1°) Le dosage suivant la technique de O. MEULEMANS : c'est un dosage spectrophotométrique. Ce dosage est basé sur la précipitation des protéines par de l'acide trichloracétique. L'acide trichloracétique employé est une solution à 3 % préparée à partir d'acide trichloracétique à 40 %.

Le dosage est établi par différence d'absorption à partir d'un témoin préparé avec du sérum physiologique. Nous utilisons pour cela des ballons jaugés de 5 ml :

- ballon témoin : 1 ml de sérum physiologique + 4 ml d'acide trichloracétique ;

- ballon avec L.C.R. : 1 ml L.C.R. + 4 ml acide trichloracétique.

La lecture au photomètre se fait à une longueur d'onde de 4 500 Å. Nous obtenons ainsi la densité optique du liquide.

La concentration protéique du L.C.R. est égale au produit de la densité optique par la pente d'une courbe étalon réalisée par dilutions successives d'une solution protéique standard (1).

2° Le dosage colorimétrique par l'Amido-Schwarz 10 B :

Cette technique très simple est d'un emploi aisé et permet une détermination immédiate ; sur du papier à électrophorèse (Schleicher et Schüll, n° 2 043 a MgI) on dépose 25 mm³ de L.C.R. On sèche sous infra-rouge et on colore par un bain d'Amido-Schwarz 10 B à 10 g °/° dans méthanol-acide acétique (8 : 2 ($\frac{V}{V}$)). On décolore par de l'acide acétique-méthanol-eau (7,05, 2,5 ($\frac{V}{V}$)) et on compare à une gamme étalon.

(1) : Mono-trol B-D Mérieux.

Cette méthode permet d'apprécier des quantités protéiques de l'ordre de 5 mg ‰ avec une précision de 20 % environ, permettant ainsi :

- d'évaluer rapidement et très économiquement le produit,
- d'éviter des erreurs toujours possibles par une méthode de floculation.

La concentration :

Nous nous sommes attachés à mettre au point une technique facile à mettre en oeuvre, rapide, non dénaturante.

Nous avons écarté :

- l'ultrafiltration, méthode peu rapide nécessitant un matériel déjà important,
- la lyophilisation qui est parfois dénaturante,
- la per-évaporation, longue et dénaturante,
- la précipitation par l'acétone à froid qui est incomplète.

Nous nous sommes orientés vers les méthodes de dialyse contre des solutions macromoléculaires :

a) Le sac de dialyse : il existe dans le commerce des boyaux cellulosiques parfaits pour cet usage. Nous en utilisons un de faible diamètre pour nos quantités de L.C.R. (1).

b) La solution macromoléculaire : son choix est important. Elle doit être d'un poids moléculaire moyen élevé pour éliminer tout passage de cette solution dans le liquide à concentrer, passage qui entraîne une dénaturation par absorption des protéines sur les macromolécules : nous avons ainsi abandonné le Polyvinyl Pyrrolidone et nous utilisons actuellement le Polyéthylène Glycol de poids moléculaire moyen 25 000. Il nous est livré en palettes que nous émulsionnons au Turmix à 30 000 tours à une concentration de 60 %.

Le boyau cellulosique à l'intérieur duquel a été mis le L.C.R. est plongé dans cette solution de Polyéthylène Glycol à 60 %.

(1) Boyau Nojax 18 (Ets SOPHYCA).

Par cette technique, 100 ml de liquide sont amenés à 1 ml en 2 heures.

Aucune dénaturation n'est notée sur un sérum dilué et reconcentré 500 fois par cette technique. Il est à noter que sur d'autres liquides (urines par exemple) cette méthode nous permet des concentrations rapides de 1 000 à 3 000 fois sans dénaturation (MANUEL).

III/ METHODES ELECTROPHORETIQUES

A) Electrophorèse sur papier

L'électrophorèse sur support papier a été faite suivant la technique et le matériel préconisés par GROULADE.

C'est une technique peu sélective mais qui demeure indispensable pour avoir une première approximation quantitative des différentes fractions protéiques. Elle n'est pas sans inconvénients : en effet, à l'action du champ électrique s'oppose celle des courants d'électro-endosmose de direction inverse, qui perturbent considérablement la migration protéique, ainsi que des phénomènes d'évaporation. Ces faits sont trop connus pour que nous les étudions en détail, mais ils expliquent qu'il soit impossible d'obtenir par électrophorèse sur papier des mobilités qui soient rigoureusement les mêmes d'une migration à l'autre. Néanmoins cette technique simple donne une approximation très suffisante et permet une première étude à la fois qualitative et quantitative intéressante.

L'appareil mis au point par GROULADE permet d'opérer dans des conditions optima autorisant des migrations sur 6 ou 7 bandes à la fois ; il permet des comparaisons de mobilité d'une bande à l'autre : en effet, un double dispositif assure une étanchéité parfaite et une évaporation presque inexistante, ceci permet un front de migration linéaire d'une bande de papier à l'autre.

Nos migrations sont réalisées sous une différence de potentiel de 70 volts aux bornes de l'appareil (3 volts/cm) pendant une durée de 16 heures.

Nous utilisons comme colorant l'Amido-Schwarz 10 B

en solution méthanol-acide acétique ; comme décolorant, des bains successifs d'un mélange méthanol-acide acétique-eau. Enfin, la lecture des résultats est effectuée par photométrie (1).

B) Electrophorèse en gel d'amidon

La deuxième technique d'électrophorèse de zone que nous avons utilisée, est la technique d'électrophorèse en gel d'amidon. Le support utilisé est composé d'un gel fabriqué à partir d'un amidon partiellement hydrolysé.

Si l'encombrement de la molécule ne jouait qu'un rôle restreint par rapport à sa charge électrique dans l'électrophorèse sur papier, il devient au contraire un facteur non négligeable dans la technique en gel d'amidon que nous devons à SMITHIES.

En effet, on peut grossièrement considérer que le gel d'amidon se conduit comme un tamis moléculaire, superposant ainsi aux critères purement électriques un autre critère : la dimension et la forme de la molécule. La finesse de ces mailles freine les grosses molécules protéiques, laissant au contraire librement passer les petites molécules.

Ainsi, migreront très en avant les molécules de faible poids moléculaire et resteront au contraire près de la fente d'inclusion les molécules de gros poids moléculaire, ceci à charge électrique égale. Enfin, les très grosses molécules protéiques ne pourront pas migrer dans ce gel, quelle que soit leur charge électrique. Cette technique se révèle, quant au sérum, très précieuse puisqu'elle permet de séparer un très grand nombre de constituants que l'électrophorèse sur papier ne permettait pas d'individualiser.

1°) Fabrication du gel d'amidon

Nous utilisons pour la fabrication de ce gel, la technique de SMITHIES modifiée par FINE. Nous nous servons d'un amidon préparé industriellement (2). Sur chaque lot, en effet, on trouve indiqué la quantité d'amidon utilisable pour 100 ml de tampon, tampon dont la composition a été étudiée en fonction du degré d'hydro-

- (1) : Enregistreur d'extinction avec intégrateur Zeiss.

- (2) : "Connaught Medical Research Laboratory" de Toronto.

lyse de chaque lot.

La quantité d'amidon indiquée (13 g % environ), est mélangée à froid par agitation énergique dans le tampon choisi dans un Erlen-Meyer en Pyrex. On chauffe ensuite directement à la flamme d'un bec Bunsen sans jamais cesser d'agiter. Au bout de quelques minutes, la solution d'amidon s'est épaissie pour devenir adhérente aux parois de l'Erlen-Meyer ; cette pâte va se reliquéfier et devenir translucide. Des bulles de plus en plus grosses vont se former au fond du récipient ; on peut alors arrêter le chauffage. On fait le vide dans le ballon pour dégazéifier le gel liquide. Il suffira ensuite de le couler dans des cuves préparées à cet effet et de le laisser refroidir.

A ce stade quelques précautions sont à prendre :

- La première concerne la quantité d'amidon à préparer pour 100 ml de tampon. Il s'agit en effet d'un amidon partiellement hydrolysé, or, la quantité d'amidon à utiliser pour la fabrication du gel dépend étroitement du degré d'hydrolyse de cet amidon. Il est assez facile, avec l'habitude, de se rendre compte de la consistance du gel obtenu. Le gel d'amidon devra en effet avoir un aspect parfaitement opaque après refroidissement, légèrement rénitent au doigt, à la fois souple et résistant. Or, parfois, le gel refroidi est translucide, visqueux : la quantité d'amidon est alors trop faible, il faudra par tâtonnement, rechercher la quantité optima d'amidon.

- La seconde précaution à prendre est d'éviter un chauffage trop prolongé. On a souvent intérêt à chauffer moins et à commencer la dégazéification à la limite même de l'ébullition sous vide, de la solution d'amidon après chauffage.

- Enfin une dernière précaution consiste à agiter vigoureusement le mélange pendant toute la durée du chauffage, sans interruption.

Au bout de 2 heures environ, le gel coulé se refroidit et se présente comme une masse homogène, opalescente, légèrement résistante au doigt.

Le gel est ensuite arrasé : la couche supérieure est jetée, la couche inférieure a alors une épaisseur de 6 mm, condi-

tion d'une migration régulière.

A l'aide d'un emporte-pièce (10 x 1 mm), on découpe alors une fente dans le gel, dans laquelle on inclut le liquide à analyser suivant un protocole que nous verrons plus loin. Les fentes sont distantes les unes des autres de 7 à 10 mm. On doit prendre une précaution essentielle : il faut vérifier que lors de la préparation de la fente d'inclusion, on n'a pas décollé le gel de la cuve qui lui sert de support, en retirant l'emporte-pièce. Cette vérification se fait par transparence devant une lampe, sinon il peut se produire des diffusions du produit inclus, d'une fente à l'autre. Si une bulle d'air est repérée ainsi, il suffit de la chasser en réappliquant au doigt le gel.

La conception des cuves que nous utilisons est entièrement originale (MANUEL).

Principe : Nous utilisons des cuves en matière plastique permettant un contact direct entre le tampon et la cuve porte-électrode.

A) Description de la cuve

Ce modèle présente une surface utile d'amidon de 22 x 8 cm. L'épaisseur du gel d'amidon obtenu est de 6 mm, la longueur totale de la cuve est de 26 cm, compte tenu de l'épaisseur des ponts eux-mêmes. La longueur des ponts est de 3 cm.

Les cuves sont faites en plexiglas d'une épaisseur sur les côtés, de 1 cm, qui en assurent une parfaite rigidité. La largeur de 8 cm permet de faire 3 fentes d'inclusion par cuve ; ces fentes d'inclusion sont faites à 6 cm d'un des bords de la partie utilisable des gels, ce qui correspond à 8 cm d'une des extrémités de la cuve.

B) Description de la cuve porte-électrodes

Nous utilisons des cuves de très grande capacité qui comprennent 2 compartiments : un compartiment porte-électrodes relié par l'intermédiaire d'une cloison en plexiglas percée de trous de communication, un deuxième compartiment dans lequel seront placés les ponts des cuves que nous venons de décrire.

La longueur de ces bacs permet de placer 3 cuves à la fois, permettant ainsi 9 électrophorèses simultanées.

Dimensions de ces bacs porte-électrodes

- longueur : 32 cm
- largeur : 9 cm
- hauteur : 6 cm

Les compartiments ont chacun 4,5 cm de large. La barette porte-électrodes a une longueur de 28 cm. L'électrode elle-même est constituée par un fil de platine de 8/10 mm de diamètre. La longueur de cette électrode permet une répartition électrique meilleure.

Enfin, pendant toute la durée de la migration, on place sur les cuves utilisées une plaque de plexiglas distante de 0,5 cm du gel, plaque recouvrant toute la surface du gel.

2°) Les tampons utilisés

Ils sont de 3 sortes : tampon continu borate-borate, tampon discontinu tris-borate, enfin tampon spécial glycolle soude.

Le tampon utilisé de façon standard était le tampon continu borate-borate. Il faut en effet distinguer le tampon qui sert à faire les gels mêmes et le tampon que l'on met dans les cuves.

Le système sera continu si les 2 tampons sont de même nature, discontinu si les tampons sont de nature différente. L'avantage du discontinu réside dans une meilleure définition des bandes protéiques séparées. Il se produit par ailleurs, un front de migration du tampon cuve dans le gel, ce qui permet dans une certaine mesure, de suivre la migration elle-même.

Dans nos études standard, nous avons toutefois préféré utiliser le tampon continu, car ce système était celui qui nous donnait les meilleures séparations concernant les protéines particulières du liquide céphalorachidien.

a) Tampon continu borate-borate

Le tampon "gel" : sa composition varie avec le degré

d'hydrolyse de l'amidon. Il est composé d'une solution à 0,023 M d'acide borique et 0,0092 M de Na OH.

Le tampon "cuve" est composé d'acide borique 0,3 M et NaOH 0,06 M à pH 8,4.

b) Tampon discontinu "tris-borate"

Le tampon "gel" : tris (hydroxyméthyl) aminométhane 0,076 M, acide borique 0,005 M à pH 8,4.

Le tampon "cuve" est identique au précédent.

c) Tampon discontinu glyocolle-soude

Le tampon "gel" : Glyocolle 0,05 M ajusté à pH 8,8 par NaOH 0,05 M.

Le tampon "cuve" : tris (hydroxyméthyl) aminométhène HCl 0,1 M amené à pH 9,2 par HCl 0,1 M.

3°) Techniques d'inclusions

La technique d'inclusion est dérivée de celle décrite par FINE. La méthode que nous utilisons a l'avantage de ne demander que peu de produit, d'être rapide et de permettre des dilutions complémentaires.

On prépare 10 ml d'une solution d'amidon soluble Merck dans le tampon utilisé pour la fabrication des gels. Dans un Erlen-Meyer de 20 ml on chauffe jusqu'à éclaircissement et début d'ébullition de cette solution. On refroidit à 50° C sous courant d'eau, et dans un petit tube, juste avant l'inclusion on mélange 2 gouttes de cette solution avec 2 gouttes de produit à analyser. On évite ainsi toute dénaturation due à la chaleur.

Il est parfaitement possible de modifier ceci, et de mettre des rapports 2 pour 3, 1 pour 3, 1 pour 4 gouttes. Ceci permet, en cas d'échantillon de faible teneur protéique, d'augmenter d'autant la concentration relative de cette protéine.

Après mélange à la pipette, on dépose au fond de la fente d'inclusion la solution obtenue.

Pour les sérums, nous les diluons au préalable avec une solution à 1 ‰ de bleu de Chicago (Geigy 536) dans du sérum physiologique. En effet, un des inconvénients de la technique en

tampon borate-borate est qu'elle ne permet pas de suivre la migration. Or, le bleu Geigy se fixe électivement sur l'albumine humaine sans la dénaturer, permettant ainsi de suivre la migration, qui sert de repère. La labilité de sa fixation sur l'albumine est telle que ce colorant ne gêne en rien les colorations ultérieures.

Cette précaution est importante car, comme nous le verrons pour le liquide céphalorachidien, il est indispensable d'obtenir des migrations relativement courtes car les fractions les plus intéressantes migrent très en avant de l'albumine et très en arrière des gamma globulines.

4°) Démoulage, coloration, décoloration et conservation

Le démoulage se fait dans une solution d'acide acétique à 5 % pour éviter toute cassure. Le gel démoulé est pris sur une plaque en plexiglas que l'on retourne, ce qui permet de le retirer du bain sans aucune manipulation : il est ensuite retourné sur une glissière en plexiglas (voir schéma) d'une profondeur de 3 mm. A l'aide d'un fil d'acier, on coupe ce gel en 2 tranches de 3 mm chacune : on garde la partie inférieure qui est colorée à l'Amido-Schwarz 10 B, colorant qui s'avère supérieur à l'azo-carmin, d'une part parce qu'il supporte mieux la décoloration et d'autre part parce qu'il a un meilleur rendement à la photographie. Le bain colorant est obtenu en diluant 50 fois dans de l'acide acétique à 5 %, une solution stock d'Amido-Schwarz 10 B à 1 % dans un tampon acide acétique 0,5 M-acétate 0,05 M. Après une durée de coloration de 30 minutes, il est ensuite décoloré dans des bains successifs d'acide acétique à 5 % de 24 heures chacun.

On attend la décoloration totale et on photographie par transparence sur film Kodak "plus X".

"Glycéro-dessication" du gel obtenu : Si on veut pousser plus loin l'étude des constituants, et, principalement si on veut essayer de faire une analyse quantitative, il est possible de rendre le gel à la fois transparent et manipulable : il faut après coloration, mettre le gel dans une série de bains décolorants d'acide acétique à 5 % et de glycérol bidistillé à 10 %. En fin de décoloration, le gel est posé sur une plaque de verre et mis à l'étuve à 70° C.

Au bout de 3 heures environ, on décolle les bords du

gel pour éviter toute déchirure. Ensuite, au bout de 24 à 48 heures, la dessiccation est complète et le gel ressemble lui-même à une feuille de plastique : il est très souple, parfaitement transparent et se prête aux analyses photométriques comme aux procédés de révélation par contact (autoradiographie par exemple).

C) Immunoélectrophorèse

Due à GRABAR et WILLIAMS, cette technique se fait en 2 temps :

- une migration électrophorétique avec comme support un gel de gélose,
- une révélation immunologique des fractions ainsi séparées.

Les résultats de l'électrophorèse en gélose sont superposables à ceux de l'électrophorèse sur papier : cette technique permet de séparer 5 fractions protéiques dans le sérum : albumine, alpha-1-globuline, alpha-2-globuline, bêta-globuline et gamma-globuline.

On dispose ensuite dans des rigoles découpées parallèlement à l'axe de migration, un sérum, généralement de Cheval ou de Lapin préalablement immunisé contre du sérum humain ou du L.C.R.humain. Ce sérum contient donc des anticorps anti-protéines du L.C.R. Chaque anticorps est spécifique d'une de ces protéines qui se conduit elle-même comme un antigène. Il est possible de différencier par cette technique de nombreuses autres catégories protéiques dans les fractions protéiques qui ont été préalablement dissociées par l'électrophorèse en gélose.

Rappelons pour terminer que si la diffusion de l'immun-sérum est une diffusion linéaire, parallèle à cette rigole, la diffusion des protéines, elle, est une diffusion concentrique à la tache de migration de cette protéine, puisque dans la technique que nous utilisons, l'inclusion est punctiforme ; cela explique que la ligne de précipitation antigène-anticorps soit une ligne courbe.

Cette notion appelle une remarque importante : la rapidité de diffusion dans le milieu gélose de l'immun-sérum est toujours la même pour une série d'immunoélectrophorèses considérées, puisque l'immun-sérum utilisé est le même, par contre, la rapidité

de la diffusion dans la gélose de chaque fraction protéique va être étroitement dépendante de sa forme et de sa masse moléculaire ; si bien qu'une protéine de faible encombrement ou de faible masse moléculaire, diffusera beaucoup plus vite qu'une macromolécule par exemple. Ainsi donc, la place même par rapport à l'axe de migration de la courbe de précipitation antigène-anticorps pourra donner une idée sur la dimension de la molécule protéique qui l'a produite.

Un deuxième point intéressant à noter, est la difficulté qu'il y a à obtenir une ligne de précipitation dont l'intensité soit proportionnelle à la quantité de protéines qui l'a produite. En effet, si l'on utilise l'immun-sérum de Cheval, il existe un rapport optimum antigène-anticorps, rapport optimum qui conditionne l'intensité de la ligne de précipitation observée. Pour l'immun-sérum de Cheval, ce rapport se situe dans les limites relativement étroites, tout excès d'antigène par rapport à l'anticorps, ou, inversement, tout excès d'anticorps par rapport à l'antigène, provoquera une redissolution partielle ou complète de cette ligne de précipitation, si bien qu'il faut savoir qu'une absence, ou une faible ligne de précipitation, ne veut pas forcément dire absence ou faible quantité de la protéine correspondante, mais peut vouloir dire aussi excès de cette protéine par rapport à l'anticorps apporté par l'immun-sérum, ou, inversement, excès de l'anticorps par rapport à la protéine considérée. Ce phénomène correspond à une courbe appelée "d'équivalence étroite" par les immunologistes en opposition à la courbe "d'équivalence large" qui caractérise d'autres animaux : c'est ainsi que chez le Lapin ou la Chèvre, les anticorps produits donnent des réactions de précipitation antigène-anticorps qui sont beaucoup moins sensibles au rapport antigène-anticorps (équivalence large).

Il n'est pas dans notre propos d'examiner toutes les techniques d'immunoélectrophorèses ; la technique que nous proposons est originale : elle est dérivée de la microtechnique de SCHEIDEGGER. Toutefois, la technique de SCHEIDEGGER a été considérablement modifiée. Nous utilisons une plaque de verre de dimensions : 25 x 8 cm, ce qui nous permet de faire 13 à 14 immunoélectrophorèses parallèlement les unes aux autres. En effet, notre principale préoccupation a été l'identification de certaines fractions

protéiques par rapport à celles trouvées dans d'autres liquides, principalement celles, déjà bien connues, du sérum sanguin ; il était donc indispensable que nous ayons à notre disposition une technique qui permette de comparer très exactement les mobilités de chaque ligne de précipitation obtenue. Il fallait donc avoir des conditions de migration parfaitement standardisées et rigoureusement parallèles. Il fallait en plus une technique d'emploi suffisamment simple pour être utilisée en série. Nous donnons dans notre figure une photographie explicative.

a) Préparation des plaques de gélose :

La gélose que nous utilisons est une gélose Difco (1) que nous préparons en solution stock à 6 %. La gélose est dissoute à l'étuve à 90° C pendant 48 heures, dans de l'eau distillée. Elle est ensuite étalée en couche de 1 à 2 cm et après refroidissement, elle est découpée en petits cubes et mise à dialyser pendant 8 jours dans de l'eau distillée additionnée d'azothydrate de sodium à 1 ‰ pour éviter toute poussée bactérienne. Les cubes deviennent ensuite parfaitement blancs et sont propres à l'utilisation.

Pour l'électrophorèse, elle est ensuite amenée à une concentration de 1,5 ‰. Le tampon utilisé pour ces migrations est le tampon d'HIRSCHFELD, sa composition est :

pour 10 l de tampon : véronal sodé	105,10 g
véronal acide	16,60 g
lactate de calcium 5 H ₂ O	15,36 g (0,04 M)

On ajuste ensuite à 10 l avec de l'eau distillée.

Après plusieurs essais, nous avons préféré ce tampon au tampon véronal-véronal sodique de DURRUM (force ionique 0,05) qui sépare mal certaines fractions.

b) Migration de révélation

Sur une plaque de 25 x 10 cm nous déposons 60 ml de gélose à 60° C. Après refroidissement, nous posons cette plaque sur une feuille de papier sur laquelle a été au préalable tracé le schéma des fentes et des points d'inclusion à faire dans cette gélose,

(1) Gélose Difco Bacto-Agar.

comme le montre la figure. Ceci est fait très simplement par 2 lames de rasoir accolées sur une plaque de chlorure de polyvinyl qui les maintient rigides et à un écartement constant de 1,5 mm. Le tracé des rigoles dans lequel sera mis ensuite l'immun-sérum est fait à main levée : avec une certaine habitude ceci se fait très rapidement et d'une façon très satisfaisante. La migration est conduite dans les cuves, type GROULADE que nous avons décrites plus haut.

Les conditions d'humidité constante caractéristiques de cette cuve, permettent des migrations strictement parallèles d'une extrémité à l'autre de la plaque.

La migration a une durée comprise entre 2 et 3 heures sous une différence de potentiel de 60 volts. Une fois la migration effectuée, nous enlevons la petite bande de gélose dans les rigoles qui ont été préalablement découpées. Nous y mettons l'immun-sérum et nous laissons diffuser 48 heures. La plaque est ensuite lavée au sérum physiologique pendant 48 heures, lavée une deuxième fois à l'eau distillée pour éliminer les sels pendant quelques heures et ensuite séchée sous une lampe à rayonnements Infra-Rouges pendant 2 heures. La plaque est mise dans un bain colorant qui a été fait à partir d'un mélange d'acide acétique à 20 % et d'une solution stock d'azocarmin à 1 % dans un tampon acide-acétate.

La coloration a une durée de 1/4 d'heure, la décoloration est très rapide. Elle se fait dans un bain d'acide acétique à 5 % pendant 1/4 d'heure, la plaque est séchée et prête à photographier.

c) Analyse immunologique d'une électrophorèse en gel d'amidon

L'analyse immunologique à partir d'une électrophorèse en gel d'amidon est impossible à faire directement. En effet, l'opacité des gels empêche toute révélation des lignes de précipitation ; cette analyse immunologique est pourtant extrêmement précieuse puisqu'elle permet d'analyser des sous-fractions protéiques et qu'elle est de plus extrêmement sensible. Nous proposons un artifice qui permet de résoudre de façon satisfaisante ce problème. Après électrophorèse en gel d'amidon, nous démoulons directement le gel sur la glissière en plexiglas que nous avons décrite. Ce temps

est effectué sans fixation préalable. Une des tranches de 3 mm est colorée normalement et sert de témoin, une deuxième tranche est posée sur sa section sur une plaque de gélose de 28 x 10 préparée dans les conditions qui ont été décrites plus haut.

Directement sur la plaque, on découpe au bistouri, en prenant soin de ne pas toucher la gélose, le gel d'amidon de façon à éliminer les bandes de gel qui se trouvent entre les migrations. Entre les 3 bandes restantes, on découpe avec le même dispositif que celui utilisé pour l'immunoélectrophorèse, une rigole située à égale distance des bandes restantes.

Les fractions protéiques situées sur la tranche de section du gel vont diffuser dans la gélose qui est à leur contact. Au bout de 24 heures, on enlève les bandes de gel d'amidon. On avait au préalable, après 3 heures mis l'immun sérum dans la rigole. On est alors placé dans les mêmes conditions que pour le dernier stade de l'immunoélectrophorèse classique.

Cette méthode donne des résultats excellents et nous a été particulièrement utile pour les autoradiographies.

d) Immun sérums utilisés

Pour les migrations standards les immun sérums de référence sont constitués d'un mélange à parties égales d'immun sérums équins n° 223 et 306^x.

Immun sérums spéciaux :

- anti-Chien, obtenu par immunisation de Lapins. Des Lapins de 2 à 3 kg sont injectés par voie intra-péritonéale avec un mélange de 3 parties d'alginate de sodium à 4 % et d'une partie de chlorure de calcium à 1 %. Puis on introduit, par la même voie, 1 ml de sérum de chien, l'alginate jouant le rôle d'adjuvant. Après 3 semaines, on injecte 0,5 ml de solution par voie intra-péritonéale le lendemain et le jour suivant on injecte par intra-veineuse 0,5 ml de sérum de Chien. Quinze jours plus tard, le sang du Lapin est recueilli par ponction cardiaque sans sacrifier l'animal et additionné d'azothydrate de sodium à 1°/∞.

Une remarque importante doit être faite : les fractions

spécifiques du liquide céphalorachidien se prêtent mal à l'immunisation, il faut donc immuniser des séries importantes d'animaux pour obtenir un résultat.

D/ L'autoradiographie

Pour caractériser la sidérophiline sur les différentes techniques employées, nous avons utilisé la propriété qui la caractérise : sa capacité de fixation du Fer. Elle se trouve à l'état normal non saturée en Fer. Nous l'avons donc saturée en Fer radioactif ^{59}Fe .

$^{59}\text{Fe}^{\text{X}}$ est en solution sous forme de chlorure bivalent. Période 45,1 jours, rayonnements bêta et gamma, gamma prédominant.

Le film utilisé est un film monocouche. ^{xx}

Méthodes enzymatiques

Nous avons eu à utiliser l'action de la neuraminidase ^X sur certaines de nos protéines. La neuraminidase est une enzyme qui détache l'acide sialique des glycoprotéines.

Elle se présente en flacons contenant 13 unités, qui, reprises dans 2 ml de tampon, donne une activité de 6,5 unités/ml.

A une solution de 2 mg de protéines, on ajoute 0,1 ml de solution de neuraminidase.

La réaction enzymatique est faite en tampon phosphate de 0,3 M pH 7 dans un boyau de dialyse à 37°C. On dialyse ensuite contre du sérum physiologique à + 4°C pendant 24 heures.

x : Préparé et distribué par la C.E.A.

xx : Kodirex monocouche Kodak

X : Neuraminidase de Vibrio-cholera Grade 3, Sigma

RAPPEL DE LA COMPOSITION PROTEIQUE DU LIQUIDE CEPHALORACHIDIEN HUMAIN

Le liquide céphalorachidien humain est caractérisé par un taux protéique total faible (200 fois moins élevé que dans le sérum). Mais en plus, contrairement à ce que pensaient les premiers auteurs, des différences essentielles existent entre le sérum sanguin et le liquide céphalorachidien qui peuvent se résumer ainsi :

1°) L'existence en quantité très élevée d'une fraction migrant dans la zone pré-albuminique sur papier, en immunoélectrophorèse et en gel d'amidon est caractéristique du liquide céphalorachidien ; elle correspond à la pré-albumine riche en tryptophane décrite dans le sérum sanguin où elle n'existe qu'à l'état de traces. Elle est d'un poids moléculaire sensiblement comparable à celui de l'albumine (S°_{20} 4,55 (MANUEL)).

2°) La présence d'une deuxième sidérophiline : cette dernière caractéristique est importante puisqu'il est possible de trouver cette protéine dans le sérum sanguin.

3°) La présence d'éléments de faible poids moléculaire ("microprotéines"), qui sont absolument spécifiques du liquide céphalorachidien, qui s'éluent tous dans la même fraction après gel filtration en Séphadex G 200, fraction qui est éluée après celle qui contient l'albumine. L'une d'elles appelée "post-gamma" globuline (LATERRE) a été étudiée et s'est révélée être une protéine de faible poids moléculaire, riche en hydroxyproline (MANUEL) donc

voisine du collagène et toujours présente dans le liquide céphalo-rachidien normal.

Mais un des points les plus curieux de cette différenciation du liquide céphalorachidien par rapport au sérum sanguin est le problème des deux sidérophilines du liquide céphalorachidien.

Le problème de la sidérophiline dans le liquide céphalo-rachidien est actuellement dominé par les travaux de PARKER et BEARN. En effet, jusqu'à ces auteurs on avait identifié une deuxième sidérophiline dans le liquide céphalorachidien différente de la sidérophiline correspondant à celle du sérum. Ce sont les travaux de BURTIN (1959), PETTE et STUPPE (1960) puis CLAUSEN (1960-1961). PETTE et STUPPE ont les premiers montré que la sidérophiline du liquide céphalorachidien traitée par de la neuraminidase se transformait en totalité en un composant ayant la mobilité du composant "tau" dans le L.C.R., c'est à dire la mobilité de la deuxième sidérophiline spécifique du liquide céphalorachidien. BARKER a étudié en détail l'action de la neuraminidase sur de la sidérophiline. Nous indiquons l'essentiel de leurs résultats.

Action de la neuraminidase sur la sidérophiline sérique

D'une façon générale, la neuraminidase agit sur une glycoprotéine en enlevant les molécules d'acide sialique qu'elle contient. Or, de récentes études sur la structure des glycoprotéines ont montré que l'acide sialique était toujours situé en bout de chaîne, si bien qu'il peut être détaché sans que le reste de la molécule subisse un quelconque changement à l'exception de son comportement dans un champ électrique. En règle générale, les glycoprotéines humaines ont une migration électrophorétique retardée à pH 8,6.

PARKER a étudié l'action de la neuraminidase en proportion croissante et il a noté que la sidérophiline passait par cinq stades successifs en électrophorèse en gel d'amidon avant d'aboutir à la position qui correspond à celle de la deuxième sidérophiline du liquide céphalorachidien. PARKER et BEARN en 1962 ont émis l'hypothèse que chaque stade successif correspondait à l'enlèvement d'un acide sialique de la molécule, or, la sidérophiline humaine contient quatre résidus d'acide sialique par molécule, ce qui fait

cinq positions possibles si l'on compte une bande correspondant à une sidérophiline dont l'acide sialique aurait été complètement enlevé.

Ces travaux ont été récemment repris par LATERRE qui confirme entièrement les données expérimentales de PARKER.

Cet aspect particulier de la sidérophiline dans le liquide céphalorachidien humain d'une part, l'action de la neuraminidase telle qu'elle est décrite par PARKER et BEARN d'autre part, faisait se poser la question de l'origine de cette sidérophiline.

Origine des sidérophilines du L.C.R. :

L'étude consacrée à cette protéine a montré qu'elle présentait la particularité d'être double dans le liquide céphalorachidien.

La première est identique à celle du sérum.

La deuxième est propre au liquide céphalorachidien.

Elle est néanmoins très voisine de la première puisqu'elle a les mêmes caractéristiques immunologiques.

C'est dire que le problème de l'origine de cette protéine s'est d'emblée posé.

Des études récentes de FRICK (1963) ont montré qu'il y avait production locale de sidérophiline (étude du passage de la sidérophiline marquée à l'iode 131) dans le liquide céphalorachidien.

ROSENTHAL et SOOTHILL se référant aux premiers travaux de FRICK et SCHEID-SEYDEL émettaient l'hypothèse d'une synthèse in situ de sidérophiline, seul fait leur permettant d'expliquer la quantité extrêmement importante de sidérophiline dans le liquide céphalorachidien surtout lorsque l'on sait que la sidérophiline suit étroitement l'albumine dans tout processus de filtration.

Les travaux de PARKER et BEARN sur l'action de la neuraminidase sur la sidérophiline sérique firent poser une question plus précise : la deuxième sidérophiline provient-elle de l'action des neuraminidases cérébrales sur la sidérophiline d'origine sérique ?

Or PARKER notait :

1°) On ne retrouve jamais dans le liquide céphalorachidien de ligne intermédiaire, en gel d'amidon, témoin de l'action partielle de la neuraminidase.

2°) On ne peut reproduire l'action de la neuraminidase par incubation de la sidérophiline avec du liquide céphalorachidien.

Il avait donc conclu à une origine tissulaire de cette deuxième sidérophiline.

LATERRE est moins affirmatif car il a pu reproduire quoique peu souvent, et surtout avec des liquides céphalorachidiens pathologiques une action neuraminidasique sur la sidérophiline en incubant cette protéine avec du liquide céphalorachidien.

Les problèmes que posaient l'origine même de cette sidérophiline, soulevaient la possibilité d'une expérimentation chez l'animal car il fallait essayer de voir si la sidérophiline était synthétisée par le tissu cérébral ou bien si la sidérophiline sérique était ou non métabolisée par une neuraminidase cérébrale.

C'est ce que nous avons essayé d'étudier plus particulièrement dans les liquides céphalorachidiens de Chiens et de Singes Babouins.

Sil'on retrouve dans le liquide céphalorachidien de ces animaux des sidérophilines modifiées, de la même façon que par action de la neuraminidase, on pourra alors, à partir d'une expérimentation chez l'animal considéré, extrapoler à l'Homme.

PLANCHE N° 1

Fig. 1 :

A droite : Immunoélectrophorèse de L.C.R. et de sérum de Babouin (immunsérum standard).

A gauche : La même immunoélectrophorèse mais révélée par autoradiographie après marquage de la sidérophiline par ^{59}Fe .

Fig. 2 :

A gauche : Immunoélectrophorèse comparative de :
- fraction riche en sidérophiline de Babouin
- la même fraction après traitement à la Neuraminidase
- un sérum de Babouin

A droite : La même immunoélectrophorèse révélée par autoradiographie après marquage de la sidérophiline au ^{59}Fe .

Fig. 3 :

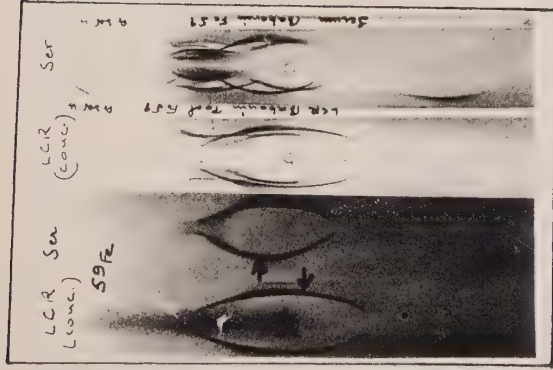
Même étude mais par électrophorèse en gel d'amidon.

Fig. 4 :

A gauche : Electrophorèse en gel d'amidon d'un "pool" de L.C.R. de Babouin concentré.

A droite : Par comparaison : préalbumine de L.C.R. humain purifiée.

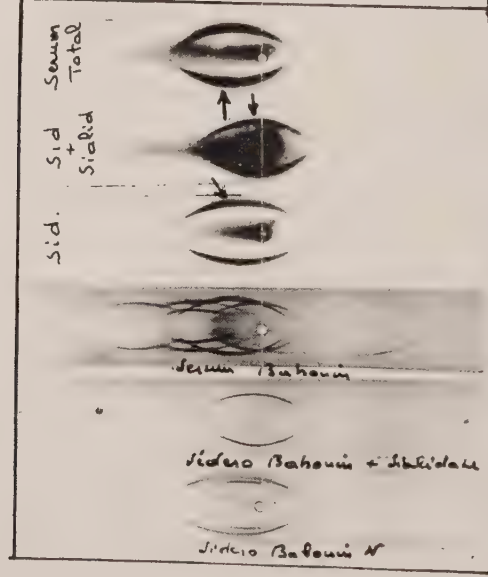
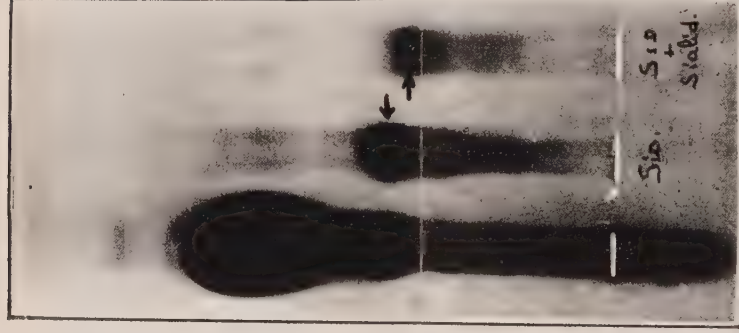
IBABOUIN



1



3



2

ETUDE DES SIDEROPHILINES (TRANSFERRINES) DES LIQUIDES CEPHALORACHIDIENS DE SINGES BABOUINS ET DE CHIENS

1° Le Singe Babouin

Les taux protéiques du liquide céphalorachidien de Singes Babouins étaient toujours proches de 0,50 g / ‰ , donc nettement supérieurs à ceux du liquide céphalorachidien humain.

Comme le liquide céphalorachidien humain, le liquide céphalorachidien de Singe Babouin est enrichi en pré-albumine par rapport à son sérum ; nous n'avons pu mettre en évidence par contre de "post-gamma" globuline comme dans le liquide céphalorachidien humain, en gel d'amidon, mais un immun-sérum spécifique révèle une "post-gamma" globuline à double courbure de mobilité, toutefois beaucoup plus élevée que chez l'homme.

Par ailleurs, il ne semblerait pas exister, en amidon de seconde transferrine.

En immunoélectrophorèse et après auto-radiographie, la transferrine du liquide céphalorachidien a la même mobilité que la transferrine du sérum de Singe correspondant.

En électrophorèse sur gel d'amidon et après révélation sur auto-radiographie on ne trouve également aucun changement de mobilité et apparition d'aucune trace de double courbure quelle qu'elle soit, il semble donc que dans le Singe Babouin il n'y ait qu'une transferrine décelable.

Action de la Neuraminidase

Pour vérifier si le comportement de la sidérophiline.

PLANCHE N° 2

Fig. 1 :

Electrophorèse en gel d'amidon :

A droite : Electrophorèse de L.C.R. et de Sérum de Chien.

A gauche : La même mais après révélation par autoradiographie.

Fig. 2 :

Immunoélectrophorèse :

A droite : Sérum et L.C.R. de Chien (immunsérum de lapin antisérum de Chien).

A gauche : La même révélée par autoradiographie après marquage de la sidérophiline par ^{59}Fe .

On note la présence d'une ligne supplémentaire nettement en avant de la ligne sidérophiline principale, cette dernière étant légèrement décalée par rapport à son homologue sérique.

Fig. 3 :

Electrophorèse en gel d'amidon révélée par un immunsérum anti-chien après diffusion intermédiaire dans une plaque de gélose :
Au-dessus : révélation à l'azo-carmin.

Au-dessous : révélation par autoradiographie après marquage au ^{59}Fe .

On note le recul de la principale ligne sidérophiline par rapport à son homologue sérique, ligne qui présente en plus une double courbure correspondant aux 2 lignes apparues en gel d'amidon (cf. Fig. 1) et l'apparition d'une ligne de mobilité beaucoup plus rapide.

Fig. 4 :

Immunoélectrophorèse : Même expérience que dans la Fig. 2 mais avec de la sidérophiline de Chien traitée par Neuraminidase.

On note l'apparition d'une très nette ligne de mobilité plus rapide après autoradiographie alors que la ligne principale est nettement ralentie.

Fig. 5 :

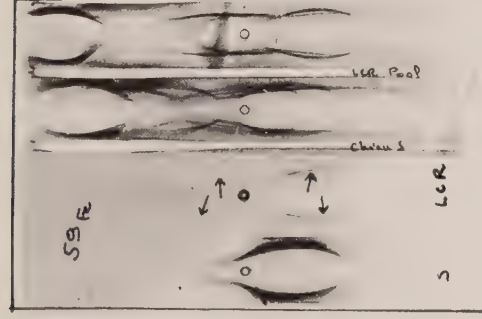
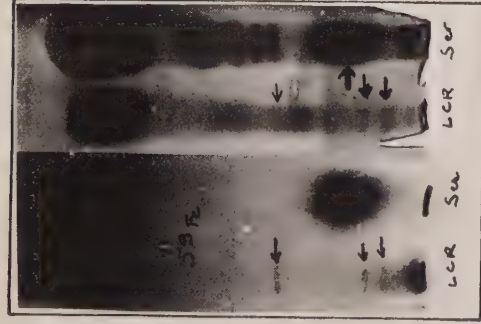
Même expérience que dans la Fig. 4 mais en électrophorèse en gel d'amidon. La ligne migrant en avant n'est pas retrouvée, la concentration obtenue étant insuffisante. Les autoradiographies n'ont pas été interprétables pour la même raison.

CONCLUSION :

Il y a identité parfaite entre les modifications de la sidérophiline dans le L.C.R. de Chien et celles obtenues après traitement par la Neuro-minidase.

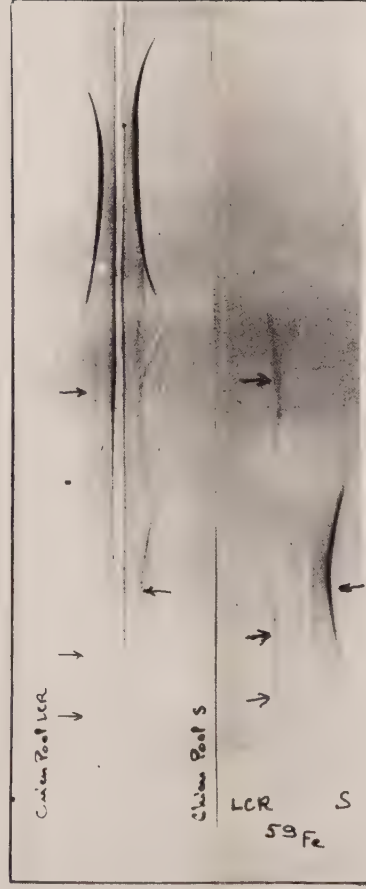
Cette identité est particulièrement frappante en immunoélectrophorèse après autoradiographie.

CHIEN

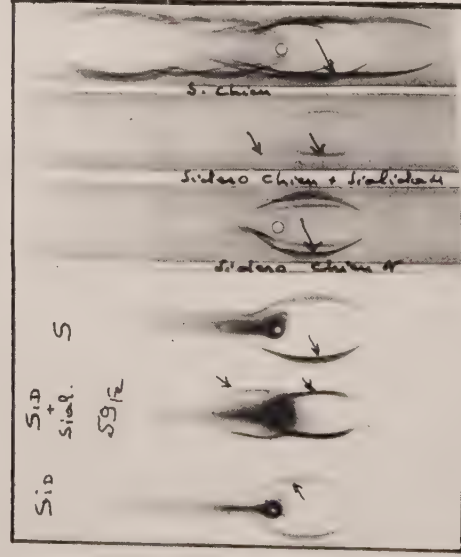


1

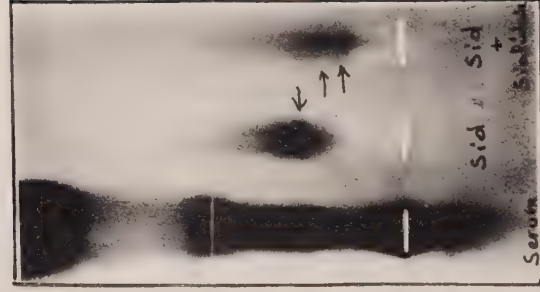
2



3



4



5

du Singe changeait de façon équivalente à la sidérophiline humaine traitée par la neuraminidase, nous avons traité par la neuraminidase dans les mêmes conditions que celles décrites pour la sidérophiline humaine, la sidérophiline de Singe que nous avons en partie purifiée. Nous n'obtenons pratiquement aucun changement après traitement par la neuraminidase dans la mobilité de la sidérophiline de Singe, ce qui tendrait à montrer qu'elle est, sinon pas, tout au moins peu sensible à l'action de cet enzyme. Ceci est tout à fait inhabituel, puisque nous le verrons pour le Chien, les choses se passent différemment.

2°) Le Chien

Nous n'avons trouvé dans le liquide céphalorachidien de Chien aucune fraction pré-albuminique, ceci en accord avec les travaux de HIEDRICH. La composition du liquide céphalorachidien est toutefois peu différente de celle du sérum. Par contre, les modifications sont très importantes lorsqu'on regarde la transferrine. En effet, par auto-radiographie, on révèle en immunoélectrophorèse 2 bandes de transferrine :

- Une de mobilité supérieure à la transferrine correspondant à celle du sérum.
- Une de mobilité inférieure à celle du sérum.
- Aucune bande correspondant à la transferrine sérique n'est notée.

Le gel d'amidon montre 2 fractions transferrines, une rapide qui semble migrer dans la zone des bêta C de SMITHIES, zone qui correspond aux haptoglobines chez le Chien, une beaucoup plus lente migrant en arrière de la sidérophiline dont la bande est très caractéristique chez le Chien et semblant présenter une hétérogénéité par l'amorce d'une double courbure après analyse immunologique du gel d'amidon. L'autoradiographie directe fait aussi soupçonner la présence de 2 composants.

Action de la neuraminidase

Après traitement par la neuraminidase de la sidérophiline partiellement purifiée : on a la surprise de voir apparaître toutes les fractions sidérophilines correspondant aux fractions sidé-

rophilines correspondant aux fractions sidérophilines du liquide céphalorachidien de Chien.

En effet, contrairement à ce qui se passe pour la sidérophiline humaine, une fraction change de mobilité avec toutefois une différence importante : la mobilité est accélérée au lieu d'être diminuée comme il est de règle dans les glycoprotéines humaines.

La réaction est en fait légèrement plus complexe puisque : si une première fraction change de mobilité dans le sens de l'accélération, une deuxième fraction, elle, par contre, change de mobilité dans le sens d'un ralentissement. De plus, cette deuxième fraction semble également se dédoubler en 2 composants.

Lorsque nous avons commencé cette étude, nous avons été frappé par l'originalité des fractions sidérophiliniques dans le liquide céphalorachidien du Chien par rapport au sérum correspondant.

Cette originalité nous avait fait penser qu'il était difficile d'expliquer la formation de sidérophilines particulières par une simple action neuraminidasique. L'expérimentation nous a montré au contraire, que l'action de la neuraminidase reproduisait très exactement les modifications spécifiques du liquide céphalorachidien.

DISCUSSION DES RESULTATS

Ces résultats appellent quelques remarques. Si l'on s'en tient à l'hypothèse émise par PARKER et BEARN, chaque modification dans la mobilité d'une transferrine correspond à l'enlèvement d'une molécule d'acide sialique. C'est ce qu'il trouve en effet, comme nous l'avons décrit au début de ce travail, par action de la neuraminidase sur la transferrine sérique humaine. Mais comme nous l'avons vu également il est impossible de retrouver dans le liquide céphalorachidien humain les bandes intermédiaires qui correspondraient aux différents stades que PARKER décrits, une bande correspondant à une protéine contenant les 5 résidus d'acide sialique, c'est-à-dire la sidérophiline normale, une bande qui n'en contient plus que quatre, une bande qui n'en contient plus que trois, une autre plus que deux, une autre plus qu'une et enfin une bande qui n'en contient plus, qui correspond à la sidérophiline du liquide céphalorachidien : cela fait donc cinq bandes possibles.

Chez le Singe Babouin, il semble que l'on trouve une seule bande après action de la neuraminidase. Cette bande serait très légèrement décalée par rapport à la sidérophiline normale. Elle est en fait si peu décalée qu'il n'est guère possible de voir si, dans le liquide céphalorachidien, la modification est superposable. Il semble qu'elle le soit sans que l'on puisse l'affirmer. Quoiqu'il en soit, cela tendrait à montrer qu'il n'y a dans la sidérophiline de Babouin qu'un résidu d'acide sialique avec la possibilité donc, de n'obtenir qu'une bande. Toutefois, contre cette hypothèse, on peut faire la remarque suivante : c'est qu'il y a très peu de différence de mobilité entre la sidérophiline du Babouin et la sidérophiline

humaine. Mais seule l'étude de la partie glucidique de la sidérophiline de Babouin, pourra permettre d'élucider ce point. Notons que, chez d'autres Singes, PARKER et BEARN ont montré que le nombre de bandes correspondait au nombre d'acides sialiques. Il faudrait donc le vérifier pour le Singe Babouin.

Le problème du liquide céphalorachidien de Chien est plus délicat : en effet, il semble cette fois-ci que l'on obtienne, après action de la neuraminidase, non pas une sidérophiline modifiée par rapport à la sidérophiline sérique, mais trois sidérophilines dont deux de mobilité très différente.

Cette dernière action de la neuraminidase qui correspond d'ailleurs exactement aux modifications rencontrées dans le liquide céphalorachidien, peut ici s'expliquer plus difficilement par l'enlèvement d'une ou deux molécules d'acide sialique qui seraient situées en bout de chaîne. Il semble qu'il y ait cette fois-ci obtention de deux fragments sidérophilines, cela seul pouvant expliquer les résultats obtenus. Là encore, seule l'analyse de la copule glucidique de cette glycoprotéine pourra permettre d'expliquer ce phénomène.

Toutefois il est à noter là encore la parfaite similitude entre les modifications que subit la sidérophiline dans le liquide céphalorachidien et les modifications que subit une sidérophiline sérique par action de la neuraminidase.

Contrairement à ce qui se passe chez l'Homme, chez le Chien il ne semble pas exister de sidérophiline correspondant à la sidérophiline sérique dans son liquide céphalorachidien. Il convient d'être prudent car pour amasser la quantité nécessaire de liquide céphalorachidien il a fallu stocker ces liquides et il n'est pas impossible que le liquide céphalorachidien de Chien ait une activité neuraminidasique supérieure au liquide céphalorachidien humain et qu'ainsi toute la sidérophiline normale qu'il aurait pu contenir ait été transformée en sidérophilines propres au liquide céphalorachidien.

Quoiqu'il en soit, il semble que le Chien, par l'aspect caractéristique de ses sidérophilines propres au liquide céphalorachidien, soit un terrain très favorable pour une expérimentation.

Il serait en effet assez facile de caractériser par auto-radiographie les sidérophilines obtenues à partir par exemple, de coupes de tissus ou de culture de tissus. D'autre part, il sera intéressant de faire, avec des immun sérums anti-sidérophiline de Chien pure, des histo-immuno-fluorescence sur des coupes de tissus cérébraux. C'est cette seule expérimentation qui pourra permettre de localiser les lieux de formation de la sidérophiline et de démontrer que cette sidérophiline est synthétisée par du tissu cérébral. MANUEL propose en effet, l'hypothèse suivante pour l'Homme comme pour l'animal : les teneurs en neuraminidase dans le cerveau sont telles que le cerveau est incapable de synthétiser par lui-même une sidérophiline qui contienne de l'acide sialique. Il ne peut donc synthétiser qu'une sidérophiline incomplète : cette hypothèse permettrait d'expliquer toutes les anomalies qui ont été décrites ci-dessus.

CONCLUSIONS

Nous avons collecté et étudié des liquides céphalorachidiens de : Singes Patas
Singes Babouins
Chiens

Des différences importantes sont apparues dans la composition protéique de ces liquides céphalorachidiens et celle des sérums correspondants.

Nous avons trouvé une correspondance parfaite entre : l'action de la neuraminidase sur les sidérophilines humaines, par rapport aux sidérophilines de Mammifères, d'origine sérique, et les modifications qui différencient les sidérophilines du liquide céphalorachidien de l'Homme et des Mammifères par rapport à la sidérophiline sérique.

Ces constations sont juxtaposables à celles décrites chez l'Homme.

Ces modifications étant particulièrement nettes chez le Chien, nous proposons cet animal en vue d'une expérimentation pour la détermination de l'origine des sidérophilines propres aux liquides céphalorachidiens. Nous pourrons ensuite extrapoler ces résultats à l'Homme.

Le Président de la Thèse :

Neuville

VU et permis d'imprimer
LYON, le 8 JUI 1965

Le Recteur, Président du
Conseil de l'Université,

Guin
115

VU, le Doyen :

Neuville

cerebrospinal fluid in demonstration of trace proteins in biological fluids : Proc. Soc. exp. Biol. 1962, 109, 91.

HOCHWALD G.M., THORBECKE G.J. : Trace proteins in cerebrospinal fluid and other biological fluids:

I effect of various fractionation procedures on beta trace and gamma-trace proteins and methods for isolation of both proteins.

II Effect of storage and enzymes of the electrophoretic mobility of beta-trace and gamma-trace in cerebrospinal fluid.

I : Arch. Biochem 1963, 101, 325.

II : Clin. Chim. Acta, 1963, 8, 678.

KARCHER D., LOWENTAL A., VAN SANDE M. : L'origine des protéines du liquide céphalorachidien : Clin. Chim. Acta 1958, 3, 76.

KUTT H., MacDOXELL F., CHAPMAN L., PERT J., HURWITZ L.J. : Abnormal protein fractions of cerebrospinal fluid demonstrated by starch gel electrophoresis : Neurology, 1960, 10, 1 064.

LATERRE E.C. : Les protéines du liquide céphalorachidien à l'état normal et pathologique : Thèse d'agrégation Louvain (Belgique), Arscia (Ed) 1964.

LATERRE E.C., HEREMANS J.F. : A note of proteins apparently "specific" for cerebrospinal fluid : Clin. Chim. Acta, 1963, 8, 220.

LATERRE E.C., HEREMANS J.F., CARBONARA A.O. : Immunochemical comparison of some proteins found in cerebrospinal fluid, urine and extracts from brain and kidney : Clin. Chim. Acta : 1964, 10, 197.

LATERRE E.C., CARBONARA A.O., HEREMANS J.F. : Les protéines tissulaires du liquide céphalorachidien et de l'urine humaine normale in H. Peeters (Ed) Protides of the biological fluids. Proceedings of the 12th Colloquium Bruges,

Elsevier Amsterdam 1964.

LOWENTAL A. : Acquisitions nouvelles par l'étude électrophorétique du liquide céphalorachidien dans les affections démyélinisantes de l'Homme et de l'animal : Acta Neurol. Belg. 1962 9, 62, 875.

MANUEL Y. : Communications personnelles.

MANUEL Y. : Identification dans le liquide céphalorachidien d'un composant protéique migrant dans la zone hap-globines de SMITHIES en gel d'amidon comme une transferrine particulière : 6th International Congress of Biochemistry New-York, 1964.

MORGAN E.H., LAURELL C.B. : Neuraminidase in mammalian brain : Nature, 1963, 197, 921.

MUKAI A., EJTIMA T. : Studies on sialic acid (neuraminic acid) in cerebrospinal fluid : Tohoku J. exp. Med. 1962, 77, 343

PARKER W.C., BEARN A.G. : Studies on the transferrins of adult serum, cord serum, and cerebrospinal fluid : the effect of neuraminidase : J. exp. Med. 1962, 115, 83.

PARKER W. C., HAGSTROM J.W., BEARN A. G. : Additional studies on the transferrins of cord and cerebrospinal fluid : J. exp. Med. 1963, 118, 975.

PERT J.H., KUTTH. : Zone electrophoresis of cerebrospinal fluid proteins in starch gel : Proc. Soc. exp. Biol. 1958, 99, 283.

PETTE D., STUPPI. : Dit "tau" fraktion im liquor cerebrospinalis Klin. Wschr. 1960, 38, 3 109.

ROSENTHAL F.D., SOOTHILL J.F. : An immunochemical study of the proteins in the cerebrospinal fluid : J. Neurosurg. Psychiat. 1962, 25, 177.

ROUPERT G. : L'électrophorèse des protéines du liquide céphalorachidien : Thèse imp. Foulon, Paris. 1956.

TABLE DES MATIERES

I	Méthodes et Matériels	19
II	Rappel de la Composition protéines du liquide céphalorachidien humain	38
III	<u>Etude des Sidérophilines</u>	
	1/ Singes Babouins	43
	2/ Chiens	45
IV	Discussions et Résultats	47
V	Conclusions	50

